

Białko NRT1.1 (NPF6.3) jest kluczowe dla efektywnej gospodarki rolnej

Hubert Kasprzak

Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin

Wydział Nauk Biologicznych

Uniwersytet Wrocławski

hubertvon@gmail.com

Praca napisana pod opieką: prof. dr hab. Grażyny Kłobus

Azot obok węgla, wodoru, tlenu, fosforu i siarki jest pierwiastkiem biogennym oddziałującym na wzrost i rozwój roślin. Występuje on w glebie, w postaci zarówno organicznej, jak i mineralnej. Wchodzi w skład związków o podstawowym znaczeniu dla wszystkich organizmów: kwasów nukleinowych, aminokwasów, białek, nukleotydów transportujących energię. Poza rolą żywieniową niektóre formy azotu (NO_3^- , NO) mogą także działać jako cząsteczki sygnałowe regulujące bardzo wiele procesów. Są to m. in. regulacja ekspresji genów, wzrost rośliny, struktura systemu korzeniowego, rozwój liści, stan spoczynku nasion, a także czas zakwitania. Rośliny wykształciły wiele przystosowań dających im możliwość rozwoju w warunkach wahającego się stężenia azotu w glebie. Główną rolę w żywieniu roślin odgrywają azotany, które są najbardziej obfitym źródłem azotu na glebach uprawnych. Z tego względu pobieranie, transport i redystrybucja NO_3^- stały się głównym celem współczesnych badań. W ciągu ostatniej dekady bardzo dużo dowiedzieliśmy się, w jaki sposób azot jest pobierany ze środowiska i transportowany do różnych części rośliny. Zrozumienie w jaki sposób wpływa on na fizjologię roślin znacząco poprawi efektywność upraw, a także zmniejszy jego negatywne skutki dla środowiska, takie jak eutrofizacja czy produkcja gazów cieplarnianych. Wiadomo, że w pobieraniu i transporcie azotanów uczestniczą białka należące do czterech rodzin. Jedną z nich jest rodzina NRT1/NPF. U *A. thaliana* zidentyfikowano 12 genów należących do rodziny NRT1. Szczególnie interesujący jest, gen *NRT1.1* (*AtNPF6.3*), którego produkt może pełnić funkcję transportera azotanów zarówno wysokiego, jak i niskiego powinowactwa w zależności od ich stężenia. Jest on także odpowiedzialny za samo wykrywanie azotanów, a poprzez to regulację ekspresji genów kodujących liczne białka metabolizmu azotanowego.

Wstęp

Mineralne formy azotu są pobierane przez włosniki korzenia, a czasem tak-

że poprzez strzępki mikoryzowego symbionta. W zależności od stężenia jonów w roztworze glebowym rośliny wykorzystują do ich pobierania dwa

systemy różniące się powinowactwem. Są to systemy oparte na transporterach należących do rodziny LATS (ang. *low affinity transport system*) i HATS (ang. *high affinity transport system*). Transportery LATS wykazują niskie powinowactwo do substratu i w związku z tym transportują go przy jego wysokim stężeniu. W przeciwny sposób funkcjonują transportery HATS działające wyłącznie w niskich stężeniach substratu i wykazujących do niego wysokie powinowactwo. Główną rolę w żywieniu roślin odgrywają jednak azotany, które są najbardziej obfitym źródłem azotu na glebach uprawnych. Z tego względu pobieranie, transport i redystrybucja NO_3^- stały się głównym celem współczesnych badań. Badania termodynamiki reakcji przyswajania formy NO_3^- wykazały, że forma ta pobierana jest wyłącznie aktywnie, nawet podczas jego obecności w glebie w bardzo wysokim stężeniu. Transport NO_3^- jest sprzężony z transportem protonów, a jego wydajność zależy bezpośrednio od aktywności plazmolemowej pompy protonowej, H^+ ATP-azy. W konsekwencji, w warunkach niskiego pH łatwiej jest przyswajalna forma azotanowa. Jeśli przyjrzymy się danym dotyczącym kinetyki reakcji pobierania azotanów to zauważymy, że w transporcie uczestniczą trzy typy białek różniące się właściwościami kinetycznymi: dwa z nich wykazują wysokie powinowactwo do substratu, natomiast trzeci z nich charakteryzuje niskie powinowactwo do substratu. Wśród białek o wysokim powinowactwie do azotanów jeden kodowany jest przez geny, których ekspresja jest in-

dukowana substratem (NO_3^-) i dlatego znany jest jako indukowany wysoko specyficzny system transportu (iHATS). Cechą charakterystyczną drugiego typu jest to, że geny kodujące białka tej grupy ulegają ekspresji konstytutywnie (cHATS). Białka cHATS mają znacznie większą specyficzność substratową od iHATS, choć są mniej przepustowe. Mechanizm o niskiej specyficzności (LATS) ma szczególne znaczenie przy wyższych stężeniach azotanów ($>1\text{mM}$) w środowisku, podczas gdy przy niskim stężeniu azotanów roztworach glebowych w pobieraniu uczestniczą białka systemów HATS [1].

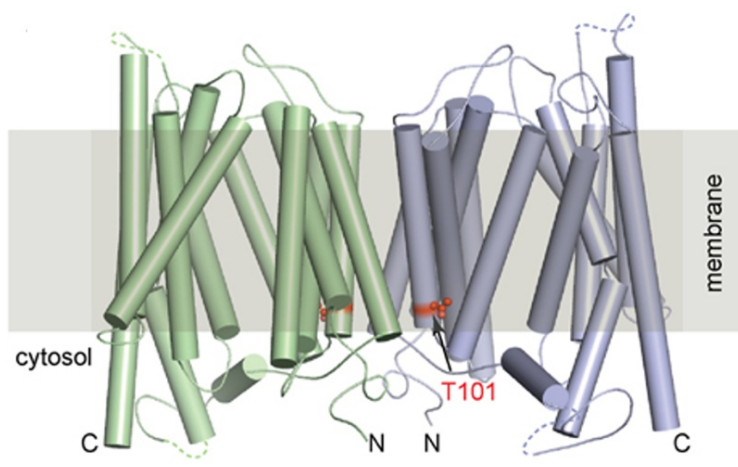
Rola NRT1.1 (NPF6.3) w pobieraniu i relokacji NO_3^- w roślinach wyższych

Wyróżniamy 2 rodziny białek biorących udział w procesach transportu azotu: transportery azotanowo/azotynowe (NNP, ang. *nitrate - nitrite porters*) i transportery peptydowe PTR (ang. *peptide transporters*). Występują one nie tylko w komórkach eukariotycznych, ale także prokariotycznych i mają zbliżoną budowę. Analizy struktury aminokwasowej białek NRT1/NPF sugerują, że tworzą one 12 helis transbłonowych połączonych krótkimi pętlami hydrofilowymi. Wyjątkiem jest duża pętla hydrofilowa łącząca helisy transbłonowe 6 i 7 [2]. Przez długi czas członków różnych rodzin białek transporterowych nazywano w zależności od tego, jaki ich substrat został w pierwszej kolejności zidentyfikowany. Przykła-

dowo dla NRT1 były to azotany, dla białek AIT - kwas abscysynowy, a dla GTR - glukozytolany. Dopiero później okazało się, że niektóre z nich transportują więcej substratów.

Członkowie rodziny NRT1 (transportery azotanowe/ transportery peptydowe) u roślin wykazują bardzo dużą homologię względem rodziny peptydowych transporterów zwierząt (SLC15/ PepT/ PTR/POT). W porównaniu jednak z nimi mają znacznie niższą specyficzność substratową i transportują większą grupę związków. U roślin początkowo zostały one uznane za transportery azotanów, a także peptydów. W ostatnich latach odkryto jednak inne ich substraty takie jak: azotyny, jony chlorkowe, auksyna, kwas abscysynowy, jasmoniany czy gibereliny [3]. U *A. thaliana* jedno z najlepiej poznanych białek należących do tej rodziny - NRT1.1 pełni dwie istotne funkcje. Po pierwsze jest ono transporterem azotanowym, który w zależności od warunków środowiskowych może wykazywać niskie bądź wysokie powinowactwa do

azotanów. W związku z tym, że początkowo wykazano, iż posiada ono dużą homologię z innymi członkami rodziny NRT1 działającymi na zasadzie transporterów o niskim powinowactwie, do tej właśnie grupy został zaliczony. Dalsze badania wykazały jednak, że mutanty NRT1.1 u roślin wykazywały ograniczone przyswajanie azotanów w warunkach ich niskiego, egzogenne stężenia. Obecnie wiemy, iż przy stężeniach odpowiednio niskich (50 μ M) białko NRT1.1 działa jako transporter o wysokim powinowactwie, natomiast przy wyższym stężeniu (4 mM) jako transporter o niskim powinowactwie do substratu. Zmienność powinowactwa jest regulowana poprzez fosforylację reszty tyrozylowej w pozycji 101 (Thr101) białka, która umożliwia rozpad dimeru wykazującego niskie powinowactwo do substratu (element systemu LATS) odpowiadającego za transport o niskim powinowactwie na dwa monomery o wysokim powinowactwie do azotanów (elementy systemu HATS) (Ryc. 1), [4]. Transporter ten wys-



Ryc. 1. Dimer białka NRT1.1 z zaznaczoną resztą Thr101 [4].

tępuje nie tylko w komórkach epidermy, ale także kory pierwotnej, endodermy, komórek przyszparkowych i wielu innych [5].

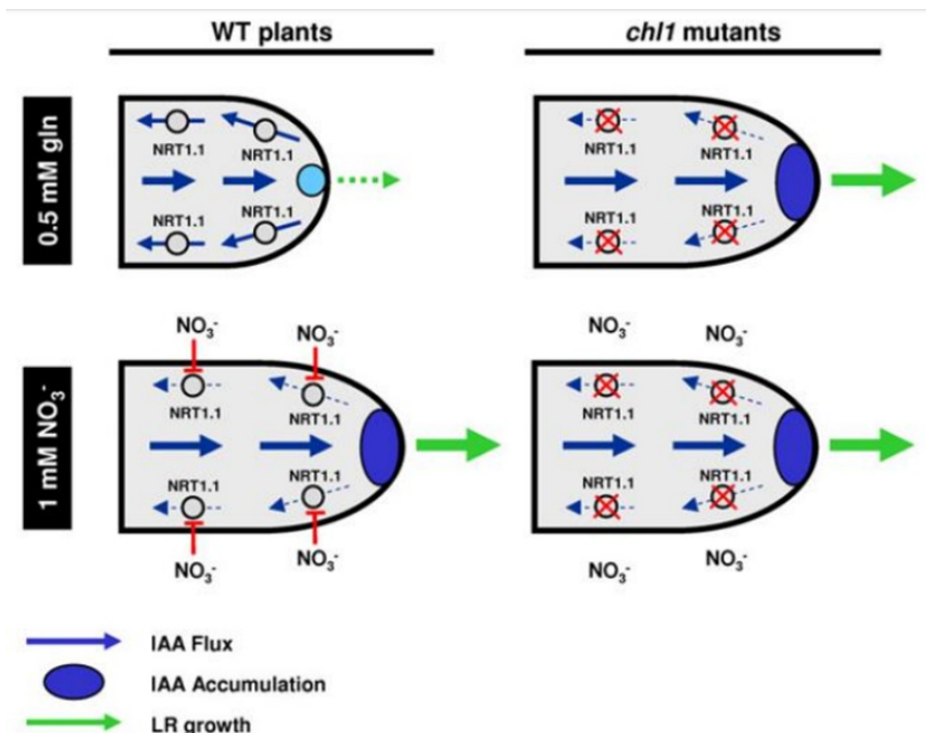
Rola NRT1.1 (NPF6.3) w transporcie hormonów roślinnych

Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że oprócz azotanów, białka NPF transportują szeroką gamę innych, często odmiennych strukturalnie substratów komórkowych.

W związku z tym, fizjologiczna funkcja tych białek nie ogranicza się tylko do transportu azotanów przez błony, ale jest dużo bardziej złożona i niezwykle istotna dla procesów wzrostowych i rozwojowych roślin. Poza azotanami związkami transportowanymi przez nie są między innymi: auksyna, kwas abscysynowy, gibereliny i jasmoniany [6]. Kluczową rolę w transporcie auksyny odgrywa białko AtNPF6.3 (AtNRT1.1). Zdolność ta jest hamowana w obecności wysokiego stężenia azotanów. Umożliwia to modulowanie wzrostu korzeni bocznych. Akumulacja auksyny w tkankach spowodowana niemożnością jej transportu powoduje wzrost tkanek [5]. Białko AtNPF6.3 (AtNRT1.1) wraz z innymi białkami takimi jak AtNPF4.6 (NRT1.2), AtNPF4.5 (AtAIT2), AtNPF4.1 (AtAIT3), AtNPF5.7 pełni funkcję transportera kwasu abscysynowego. Mutanty AtNFP4.6 posiadają niższą temperaturę tkanek na skutek częstszego otwarcia aparatów szparkowych. Potwierdza to zdolność owego białka do transportu ABA.

Rola NRT1.1 (NPF6.3) w percepcji azotowego sygnału środowiskowego i regulacji architektury korzeniowego

Głównym indykatorem azotanów w środowisku jest NPF6.3 (NRT1.1). Mutant NRT1.1 charakteryzuje się między innymi ograniczonym przyrostem korzeni bocznych. Warto dodać, że pobieranie azotanów i indukcja odpowiedzi na nie u *A. thaliana* są to odrębne procesy. Potwierdza to zachowanie normalnej indukcji odpowiedzi na wzrost stężenia azotu przy jednoczesnej niemożności jego pobierania u mutantów pojedynczą substytucją aminokwasową w genie NPF6.3. Aktywność NPF6.3 (NRT1.1) jest regulowana poprzez CBL9 (ang. *Calcineurin B-like protein 9*) - CIPK23 (ang. *CBL-interacting protein kinase 23*), który w warunkach niskiego stężenia NO_3^- fosforyluje NPF6.3 (NRT1.1), a przez to hamuje aktywność tego transportera. Z kolei białko CIPK8 promuje strategię transportu niskiego powinowactwa pod wpływem wysokiego stężenia azotanów, a także indukuje regulowaną stężeniem azotanów, ekspresję kilku genów [7]. Typowym objawem niedoboru azotu w podłożu jest wykształcanie bardzo długiego, słabo rozgałęzionego korzenia, a także silne zahamowanie wzrostu rośliny [8]. Wysokie stężenie azotanów w środowisku promuje inhibicję aktywności AtNPF6.3 (NRT1.1) polegającą na transportowaniu auksyny w korzeniach bocznych. W konsekwencji hormon ten się w nich gromadzi



Ryc. 2. Schematyczny model transportera NRT1.1.

doprowadzając do ich wzrostu. Dodatkowo NO_3^- stymuluje transkrypcję AtNPF6.3 (AtNRT1.1), a także stabilność transkryptu tego genu. Jego produkt białkowy natomiast odmiennie działa na tkanki korzenia głównego, których wzrost inhibuje i zawiązki korzeni bocznych, których wzrost promuje [9]. Wpływ transportera NRT1.1 trafnie pokazuje Ryc. 2. Mutant *chl1* nieposiadający owego transportera nie jest w stanie transportować auksyny przez co zalega ona w komórkach wierzchołka korzenia. W typie dzikim natomiast na skutek przetransportowania auksyny możliwe jest zahamowanie wzrostu korzenia, chyba że aktywność AtNPF6.3 (NRT1.1) będzie inhibowana wysokim stężeniem azotanów w środowisku [10].

Analiza sekwencji promotorowej NRT1.1 (NPF6.3) u *Cucumis sativus*

W celu wyznaczenia sekwencji promotorowej genu *CsNRT1.1* przeszukano genom ogórka dostępny na stronie NCBI pod kątem genu *CsNRT1.1* (HM772991). Wykorzystując bazę danych NCBI (GenBank) znaleziono sekwencję 1500 nukleotydów powyżej kodonu ATG, od którego rozpoczyna się sekwencja kodująca białko *CsNRT1.1*. Znajduje się ona na chromosomie 3 ogórka od 2319696 do 2321196 par zasad. Następnie poddana została ona analizie z użyciem programu *PlantCare* [11]. Umożliwia on analizę *in silico* sekwencji promotorowych w poszukiwaniu specyficznych elemen-

tów *cis*-regulatorowych. Analizując sekwencję promotora CsNRT1.1 znalaziono 20 elementów *cis*-regulatorowych. Większość motywów występuje w jednej kopii. Są to między innymi składniki systemu odpowiedzi na światło: Box 4, GTR1, LAMP-element i 3-AFR1. Wyjątkiem są występujące podwójnie motywy: ARE - odpowiadające za *cis*-aktywację podczas indukcji w warunkach beztlenowych, ERE i TATA oraz motywy zaliczane do tzw. promotora podstawowego, *cis*-aktywacyjne elementy wzmacniające, występujące aż w 33 powtórzeniach CAAT-box i 58 powtórzeniach TATA-box.

Podsumowanie

Dotychczasowe badania wykazały, że zdolność transportu azotanów oraz innych związków przez rośliny jest inna u różnych gatunków roślin i podlega regulacji przez czynniki środowiskowe. Regulacja ta odbywa się również poprzez zmieniające się stężenie azotanów w środowisku. Informacja ta jest wykrywana właśnie dzięki transceptorowi NRT1.1 (NPF6.3). Pozwala to na precyzyjną regulację ekspresji genów odpowiedzialnych nie tylko za metabolizm azotanowy, ale także regulacji architektury korzenia, czy innych procesów wzrostowych i rozwojowych roślin.

Bibliografia

[1] O'brien JA, Vega A, Bouguyon E, et al. Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Mol Plant*. 2016;9(6):837-56.

[2] Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett*. 2007;581(12):2290-300.

[3] Lérans S, Varala K, Boyer JC, et al. A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends Plant Sci*. 2014;19(1):5-9.

[4] Sun J, Zheng N. Molecular Mechanism Underlying the Plant NRT1.1 Dual-Affinity Nitrate Transporter. *Front Physiol*. 2015;6:386.5 (Wang i wsp., 2018).

[6] Corratgé-faillie C, Lacombe B. Substrate (un)specificity of Arabidopsis NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins. *J Exp Bot*. 2017;68(12):3107-3113.7 (Liu i wsp., 2015)

[8] Kopcewicz J., Lewak S. 2016. Fizjologia Roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN

[9] Bouguyon E, Perrine-walker F, Pervent M, et al. Nitrate Controls Root Development through Posttranscriptional Regulation of the NRT1.1/NPF6.3 Transporter/Sensor. *Plant Physiol*. 2016;172(2):1237-1248.

[10] Krouk G, Lacombe B, Bielach A, et al. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev Cell*. 2010;18(6):927-37.

[11] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(1):325-7.